

EKSPLORASI MIKROBA PENGHASIL ENZIM PROTEASE DARI SUMBER AIR PANAS LEJJA KABUPATEN SOPPENG SULAWESI SELATAN

Fitriani*, Hasnah Natsir, Damma Salama

Jurusan Kimia FMIPA Universitas Hasanuddin
Kampus Tamalanrea Makassar 90425

Abstrak. Protease adalah enzim yang berfungsi menghidrolisis protein menjadi molekul yang lebih sederhana. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kondisi optimum produksi protease dari bakteri *E. agglomerans* LAS-2b yang berasal dari Sumber Air Panas Lejja, Kabupaten Soppeng, Sulawesi Selatan, dengan tahapan peremajaan bakteri, pembuatan medium inokulum dan medium produksi, pengukuran OD (*Optical Density*), pengukuran kadar protein dan pengujian aktivitas protease. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa waktu produksi optimum protease adalah pada jam ke-72 (hari ke-3) dengan nilai aktivitas 0,036 U/mL, kadar protein 0,102 mg/mL. Karakteristik protease dari bakteri *E. agglomerans* LAS-2b bekerja optimum pada pH 7,0 suhu 37°C dengan nilai aktivitas sebesar 0,036 U/mL.

Kata kunci: Protease dan *E. agglomerans* LAS-2b

Abstract. Protease is an enzyme that the function is to hydrolyze proteins into simpler molecules. This study aims to determine the optimum conditions for the production of protease from *E. agglomerans* LAS-2b bacteria that derived from Lejja Hot Springs, Soppeng, South Sulawesi. The stage of this study was rejuvenation bacteria, the manufacture of medium and inoculum medium production, OD measurement, measurement of protein content and protease activity assays. The result that was obtained indicated that optimum time production is at hour-72 (days 3) with activity value is 0,036 U/ml, protein content of 0.102 mg / ml. The characteristic of protease from *E. agglomerans* LAS-2b bacteria work optimally at pH 7 at 37 °C with activity value is 0,036 U/ml.

Keywords: protease and *E. agglomerans* LAS-2b

PENDAHULUAN

Mikroorganisme merupakan salah satu sumber penghasil enzim yang memiliki nilai ekonomi penting dan banyak digunakan dalam industri sekarang ini. Oleh karena itu pencarian mikroba yang mampu menghasilkan enzim-enzim komersial perlu diupayakan. Pendekatan yang dapat diupayakan untuk mengeksplorasi mikroba penghasil enzim komersial adalah dengan cara mengisolasi dan menskrining mikroba dari alam kemudian mempelajari beberapa pengaruh terhadap produksi enzim seperti

komposisi medium, pH, suhu, variasi konsentrasi substrat dan waktu fermentasi (Onho, dkk., 1996).

Enzim merupakan suatu kelas protein yang berfungsi sebagai katalis, agen kimiawi yang mempercepat laju suatu reaksi tetapi tidak ikut bereaksi (Campbell, 2002). Enzim terdapat pada sel-sel tumbuhan, fungi, bakteri, dan hewan (Herdyastuti dan Nuniek, 2009). Enzim banyak digunakan pada berbagai bidang industri, produk pertanian, kimia, dan medis. Enzim memiliki sifat-sifat spesifik yang

*Correspondent author phone: +6282345319867,
email: vibe_chemistry@rocketmail.com

menguntungkan yaitu efisien, selektif, dapat diprediksi, reaksi tanpa produk samping, dan ramah lingkungan. Sifat-sifat tersebut menyebabkan penggunaan enzim semakin meningkat dari tahun ke tahun, peningkatan diperkirakan mencapai 10–15% per tahun (Rahayu, 2004).

Enzim protease mengacu pada sekelompok enzim yang berfungsi untuk menghidrolisis protein. Enzim protease juga disebut dengan enzim proteolitik atau proteinase. Protease menguraikan protein menjadi molekul yang lebih kecil, dimana setiap enzim protease memiliki kemampuan berbeda dalam menghidrolisis ikatan peptida (Ahira, 2011).

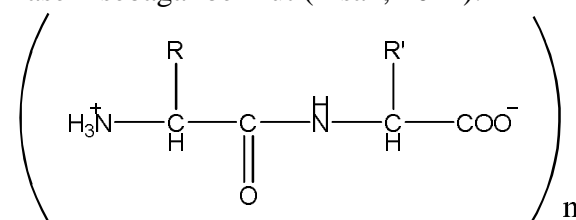
Aplikasi enzim protease dalam bidang industri banyak digunakan antara lain industri detergen, pembuatan keju, dan susu, serta dalam bidang kesehatan, misalnya mengurangi peradangan, membersihkan sel mati, mencegah penggumpalan darah, memaksimalkan sistem imun, dan menghilangkan bekas luka (Ahira, 2011).

Penelitian tentang enzim protease yang bersumber dari air panas banyak dilakukan antara lain: isolasi protease dari lokasi Sorongoti memiliki pH optimum 9,0 (Fatmawati, 2011), bakteri EP1001 penghasil protease yang bekerja optimum pada pH 10 dan suhu 75°C (Wilson and Remigio, 2012) dan isolasi protease dari bakteri isolat HMT-3 yang bekerja optimum pada pH 6,0 dan suhu 40°C (Indriyani, 2010). Isolasi enzim protease dari sumber air panas telah banyak dilakukan, namun belum dilakukan isolasi dari Sumber Air Panas Lejja dimana kemungkinan ditemukan adanya bakteri yang mampu mensekresikan enzim protease. Berdasarkan hal tersebut maka dalam penelitian ini dilakukan eksplorasi mikroba penghasil protease dari Sumber Air Panas Lejja Kabupaten Soppeng Sulawesi Selatan.

Protease ini dikarakterisasi sifat biokimianya terhadap pH dan suhu.

Kasein yang merupakan partikel yang besar dan senyawa yang kompleks tersebut dinamakan juga kasein misel (casein micell). Kasein misel tersebut besarnya tidak seragam, berkisar antara 30 – 300 mμ. Kasein juga mengandung sulfur (S) yang terdapat pada metionin (0,69%) dan sistin (0,09%). Dalam keadaan murni, kasein berwarna putih seperti salju, tidak berbau dan tidak mempunyai rasa yang khas. Selanjutnya Buda dkk. (1980) menjelaskan, bahwa kasein dapat diendapkan oleh asam, enzim rennet dan alkohol. Oleh karena itu kasein dalam susu dapat dikoagulasikan atau digumpalkan oleh asam yang terbentuk di dalam susu sebagai aktivitas dari mikroba (Belqis, 2008).

Struktur polimer kasein terdiri dari gugus karbonil, keton, amina, serta gugus samping (R). Kasein merupakan protein yang pada dasarnya terdiri atas kumpulan beberapa asam amino. Secara umum struktur kasein sebagai berikut (Ihsan, 2011):



Gambar 1. Struktur Kasein

METODE PENELITIAN

Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah air dan sedimen yang berasal dari Sumber Air Panas Lejja Kabupaten Soppeng Sulawesi Selatan, bakto agar, yeast ekstrak, bakto pepton, kasein, natrium klorida (NaCl), kalium hidrogen fosfat (K₂HPO₄), magnesium sulfat hepta hidrat (MgSO₄.7H₂O), buffer fosfat (NaH₂PO₄ dan Na₂HPO₄), natrium hidroksida (NaOH), spiritus, alkohol 70%,

*Correspondent author phone: +6282345319867,
email: vibe_chemistry@rocketmail.com

aquades, aluminium foil, kertas pH universal, reagen Lowry A (asam fosfat-fosfo-molibdat (folin) dan aquades), reagen Lowry B (natrium karbonat, NaOH, CuSO₄, natrium-kalium-tartrat), BSA (Bovine Serum Albumin), TCA (Tri Chloroacetic Acid) p.a, dan follin.

Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah neraca analitik (*Ohaus*), inkubator (*Memmert*), oven (*Memmert*), autoclave (*Model 8000-DSE Napco*), waterbath (*Memmert*), sentrifuse (*Sentrifus Universal 320 R Hettich Zentrifugen*), spektroskop 20 D+, mikropipet 100-1000 µL (*Finnipipette Campus*), cawan petri, jarum ose, lampu spiritus, shaker dan alat-alat gelas yang umum digunakan di laboratorium.

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan mulai dari bulan Januari 2013 sampai dengan Mei 2013 bertempat di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin; serta Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin.

Prosedur Penelitian

Isolasi Mikroba dari Sumber Air Panas

Sampel (air dan sedimen) diambil dari Sumber Air panas Lejja Kabupaten Soppeng Sulawesi Selatan yang bersuhu (40 – 53)°C. Sebanyak 10 mL (sampel air dan sedimen) diperkaya dalam 100 mL medium pengaya dengan komposisi medium: 0,5 % yeast ekstrak, pepton 1%, dan NaCl 1%. Selanjutnya sampel diinkubasi dalam inkubator bergoyang pada suhu 50°C dan kecepatan 200 rpm selama 48 jam. Sebanyak 0,2 mL kultur disebar dalam medium seleksi (medium liquid agar (LA)), kemudian diinkubasi pada suhu 50°C dan

37°C selama 1 hari. Isolat yang tumbuh digores kuadran hingga diperoleh isolat murni. Bakteri yang menghasilkan zona jernih di sekeliling koloni menandakan penghasil protease karena dapat menghidrolisis substratnya disekeliling koloni. Selanjutnya isolat-isolat yang murni dan memiliki zona jernih (zona bening) ditotol pada medium LA dan LA modifikasi untuk mengetahui indeks proteolitiknya (IP-nya).

Pembuatan Medium Padat

Medium padat dibuat dengan komposisi sebagai berikut: yeast ekstrak 0,5%; NaCl 1%; bakto agar 2%; kasein 0,5%; ammonium sulfat 0,7%; bakto pepton 0,1%; K₂HPO₄ 0,01%; MgSO₄.7H₂O 0,01% dan CaCl₂ 0,01% dilarutkan dalam akuades 100 mL. Selanjutnya larutan dihomogenisasi dengan *magnetik stirrer*, dipanaskan sampai larut lalu disterilkan dalam autoklaf selama 30 menit, didinginkan kemudian dituang pada cawan petri steril.

Pemurnian Bakteri

Medium padat dibuat dengan komposisi sebagai berikut : yeast ekstrak 0,5%; NaCl 1%; bakto agar 2%; kasein 0,5%; ammonium sulfat 0,7%; bakto pepton 0,1%; K₂HPO₄ 0,01%; MgSO₄.7H₂O 0,01% dan CaCl₂ 0,01% dilarutkan dalam akuades hingga 100 mL. Selanjutnya larutan dihomogenisasi dengan *magnetik stirrer*, dipanaskan sampai larut lalu disterilkan dalam autoklaf selama 30 menit, didinginkan kemudian dituang pada cawan petri steril. Kemudian bakteri yang telah ditumbuhkan diambil 2-3 ose ditanam ke dalam medium inokulum yang telah disiapkan dengan digores kuadran. Kemudian biakan tersebut dimasukkan ke dalam inkubator pada kondisi 37°C dan 50°C selama 24 jam. Perlakuan ini

*Correspondent author phone: +6282345319867,
email: vibe_chemistry@rocketmail.com

dilakukan terus menerus sampai diperoleh bakteri murni.

Pembuatan dan Penyiapan Inokulum

Medium padat dibuat dengan komposisi sebagai berikut : amonium sulfat 0,7%; yeast ekstrak 0,5%; bakto pepton 0,1%; NaCl 0,1%; K_2HPO_4 0,01%; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01%; $CaCl_2$ 0,01%; kasein 0,5% dilarutkan dalam akuades 100 mL. Selanjutnya larutan dihomogenisasi dengan *magnetik stirrer*, dipanaskan sampai larut lalu disterilkan dalam autoklaf selama 30 menit, didinginkan kemudian dituang pada cawan petri steril. Kemudian bakteri yang telah ditumbuhkan diambil 2-3 ose ditanam ke dalam medium inokulum yang telah disiapkan. Kemudian biakan tersebut dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan dikocok pada kondisi 37°C, 150 rpm selama 18-24 jam.

Pembuatan Medium Produksi

Medium produksi dibuat dengan komposisi sebagai berikut : amonium sulfat 0,7%; yeast ekstrak 0,5%; bakto pepton 0,1%; NaCl 0,1%; K_2HPO_4 0,01%; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01%; $CaCl_2$ 0,01%; kasein 0,5% dilarutkan dalam akuades 500 mL lalu dihomogenisasi dengan *magnetik stirrer* (Natsir, dkk., 2010).

Optimasi Produksi Enzim Protease

Inokulum aktif dari bakteri yang telah dikocok selama 18-24 jam sebanyak 10% dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang masing-masing telah berisi medium produksi atau medium fermentasi, kemudian dikocok kembali pada kondisi: suhu 37°C, 150 rpm selama 1 hari. Selanjutnya dilakukan sampling setiap 12 jam selama 6 hari, untuk mengetahui waktu fermentasi optimum. Sampel yang diambil setiap hari dianalisis pertumbuhannya dengan mengukur *optical density (OD)*, pengukuran

aktivitas enzim protease, serta analisis kadar proteinnya.

Pengukuran Kadar Protein Metode Lowry (Sudarmadji dkk., 1989)

Komposisi reagen Lowry B adalah Na_2CO_3 2% dalam NaOH 0,1 N : $CuSO_4$ 1% : Natrium-kalium-tartrat (100 : 1 :1) dan reagen Lowry A adalah larutan asam phospho-tungstic-phospho-molybdic (foolin) : aquades (1 : 1). Kadar protein diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum dengan menggunakan BSA (Bovine serum Albumin) sebagai standar.

Sebanyak 1 mL larutan enzim protease ditambahkan 2,75 mL larutan Lowry B, diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Selanjutnya larutan ditambahkan 0,25 mL Lowry A dan diinkubasi kembali pada 37°C selama 30 menit dengan sesekali dikocok, kemudian absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum BSA (Bovine Serum Albumin) yang telah ditentukan dengan spektrofotometer *UV-Vis*.

Pengujian Aktifitas Enzim Protease

Prosedur untuk mengukur aktifitas enzim protease adalah metode Walter (1984) yang telah dimodifikasi. Ada tiga perlakuan yaitu blanko, standar dan sampel. Sebanyak 0,1 mL larutan enzim dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 0,5 mL kasein 1% b/v dan 0,5 mL buffer fosfat pH 7. Perlakuan pada blanko dan standar, enzim diganti dengan akuades dan tirosin 0,1 mM. Larutan tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Reaksi hidrolisis dihentikan dengan cara penambahan 1 mL TCA (asam trikloroasetat) 0,1M. Pada blanko dan standar ditambahkan 0,1 mL akuades selanjutnya larutan diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 10 menit, dilanjutkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 10000 rpm selama 10 menit.

*Correspondent author phone: +6282345319867,
email: vibe_chemistry@rocketmail.com

Sebanyak 0,75 mL supernatan ditambahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 2,5 mL Na₂CO₃ 0,4 M kemudian ditambahkan 0,5 mL pereaksi folin Ciocalteau (1:2) dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 20 menit. Hasil inkubasi diukur dengan spektrofotometer pada λ = 670 nm (λ maksimum). Aktivitas enzim protease dapat dihitung dengan rumus :

$$UA = \frac{A_{sp} - A_{bl}}{A_{st} - A_{bl}} \times P \times \frac{1}{T}$$

Keterangan:

UA = Unit aktivitas enzim

A_{sp} = Nilai absorbansi sampel

A_{st} = Nilai absorbansi standar

A_{bl} = Nilai absorbansi blanko

P = Faktor pengenceran

T = Waktu inkubasi

Karakterisasi Enzim Protease dari Mikroba Termofil

Produksi protease dilakukan pada kondisi optimum, lalu dilakukan pemisahan sel dari medium dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm, 30 menit, 4°C. Supernatan yang mengandung ekstrak kasar enzim protease dikarakterisasi dengan cara: campuran (enzim : substrat : buffer) diinkubasi pada berbagai variasi kondisi, seperti pH dan suhu (Natsir, *dkk.*, 2002 dan Itoi, *dkk.*, 2007). Tahapan kerja karakterisasi seperti berikut:

Penentuan suhu optimum

Campuran 1,0 mL enzim, 1,0 mL substrat dan 1,0 mL buffer fosfat 0,2 M pH 7,0 diinkubasi selama 40 menit pada kisaran suhu 25°C, 30°C, 37°C, 40°C, dan 45°C kemudian dilakukan pengujian aktivitas protease pada setiap perubahan suhu sehingga diperoleh aktivitas protease optimum pada suhu tertentu (Natsir, *dkk.*, 2002; Rahayu, 2000).

Penentuan pH optimum

Campuran 1,0 mL enzim, 1,0 mL substrat dan 1,0 mL bufer sitrat 0,1 M dan bufer posfat 0,1 M pada berbagai kisaran pH 5; 6,0; 7,0; dan 8,0 dicampur dan diinkubasi selama 40 menit pada suhu optimum (yang telah dicapai pada perlakuan a (di atas) kemudian dilakukan pengujian aktivitas enzim protease pada setiap perubahan pH sehingga diperoleh aktivitas protease optimum pada pH tertentu (Natsir, *dkk.*, 2002; Rahayu, *dkk.*, 2004).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi bakteri dari Sumber Air Panas

Penelitian ini dimulai dengan pengambilan sampel dari Sumber Air Panas Lejja, Kabupaten Soppeng, Sulawesi Selatan dengan suhu Stasiun I (53°C), Stasiun II (48°C), Stasiun III (46°C) dan Stasiun IV (40°C). Sampel berupa air dan sedimen yang diambil pada empat titik, dimana jarak antar titik satu dengan lainnya sekitar 20 meter. Air dan sedimen ini masing-masing diambil sebanyak 10 mL dan ditumbuhkan dalam medium pengaya dengan komposisi medium 0,5% yeast ekstrak, pepton 1% dan NaCl 1%, lalu dikocok selama kurang lebih 48 jam. Setelah itu bakteri disebar pada medium padat. Penyebaran bakteri dilakukan triplo untuk mengetahui pertumbuhan rata-rata bakteri.

Hasil isolasi mikroba pada empat stasiun diperoleh 12 isolat yang memiliki aktivitas protease pada suhu 37°C dan 50°C. Bakteri isolat LAS-2b tumbuh dengan baik pada suhu 37°C, berarti bakteri termasuk dalam golongan bakteri mesofil. Kemudian pemurnian dilakukan dengan cara goresan kuadran beberapa kali hingga diperoleh isolat bakteri murni. Hal ini ditandai dengan terbentuknya koloni tunggal pada medium yang telah diberi substrat. Hasil penelitian terlihat pada Tabel 3.

Lokasi		Hasil Goresan							
		1		2		3		4	
		37° C	50 °C	37 °C	50 °C	37 °C	50 °C	37 °C	50 °C
Lokasi 1	LAS _{1a}	+	+	+	+	++	+	+++	+
	LAS _{1b}	+	+	++	+	+++	++	+++	++
	LAS _{1c}	+	+	++	+	++	+	+++	++
Lokasi 2	LAS _{2a}	++	+	++	+	+++	++	++++	++
	LAS _{2b}	++	+	+++	++	++++	++	+++++	+++
	LAS _{2c}	++	+	+++	++	+++	++	++++	+++
Lokasi 3	LAS _{3a}	+	+	++	+	++	++	+++	+++
	LAS _{3b}	++	+	++	++	+++	++	++++	++
	LAS _{3c}	++	+	+++	+	+++	++	++++	++
Lokasi 4	LAS _{4a}	++	+	++	+	+++	++	++++	++
	LAS _{4b}	++	++	++	++	+++	++	+++	+++
	LAS _{4c}	+	+	++	+	++	+	+++	++

Tabel 3 Pertumbuhan bakteri

Keterangan:

+ : sedikit

++ : kurang banyak

+++ : cukup banyak

LAS : Lokasi air + sedimen

++++ : banyak

+++++ : sangat banyak

*Data diatas diambil setelah 5 kali pemurnian pada medium padat yang berbeda. Setelah bakteri murni diperoleh, identifikasi bakteri dilakukan. Ada beberapa metode yang digunakan untuk mengidentifikasi bakteri, namun dalam penelitian ini digunakan metode konvensional, karena metode ini lebih murah dan lebih teliti. Metode konvensional ini meliputi uji IMVIC, Uji Gula-gula, TSIA (*Triple Sugar Iron Acid*), UREA, dan motilitas.

Hasil uji bakteri pada Tabel 4 disimpulkan bahwa bakteri yang diperoleh adalah bakteri *Enterobacter agglomerans*. Dengan demikian isolat ini selanjutnya diberi nama *E. agglomerans* LAS-2b. Hal

ini terlihat dari hasil uji TSIA pada bakteri menunjukkan hasil positif. Media TSIA (*Triple Sugar Iron Acid*) merupakan media yang mengandung tiga jenis gula, yaitu glukosa, laktosa, dan sukrosa. Hasil inkubasi menunjukkan bahwa karbohidrat di dalam medium mengalami fermentasi. Hal ini ditunjukkan dari perubahan warna medium yang berubah dari warna merah muda menjadi warna kuning. Artinya terjadi perubahan dari alkali (basa) menjadi asam. Bakteri tersebut tidak menghasilkan gas H₂S yang ditandai dengan tidak terbentuknya endapan hitam. Uji SIM menunjukkan bahwa uji Indol negatif, motility positif, dan

H₂S negatif. Ini menandakan terjadinya pergerakan di dalam medium yang ditandai dengan jejak pergerakan bakteri.

Hasil uji urea memperlihatkan bakteri tidak menghasilkan urease. Artinya urea tidak terhidrolisis. Hasil uji sitrat menunjukkan bahwa terjadi perubahan warna medium. Ini menguatkan hasil dari uji motility bahwa bakteri tersebut membutuhkan gerakan untuk pertumbuhan.

Penentuan Waktu Produksi Optimum Protease

Tahap awal dalam produksi enzim protease adalah peremajaan bakteri *E. agglomerans* LAS-2b. Bakteri ditumbuhkan pada medium padat kemudian dipindahkan ke medium cair yang berfungsi sebagai medium inokulum. Medium diberi kasein sebagai pemicu produksi enzim protease. Bakteri yang telah ditanam akan mengubah

inokulum menjadi inokulum aktif. Selanjutnya dimasukkan ke dalam medium produksi yang komposisinya sama dengan medium inokulum namun dengan volume lebih banyak.

Selanjutnya bakteri *E. agglomerans* LAS-2b ditumbuhkan dalam medium fermentasi pada kondisi netral (pH= 7) dan suhu 37°C dengan kecepatan aerasi 120 rpm selama \pm 6 hari. Setiap 12 jam dilakukan pengambilan sampel untuk menentukan waktu optimum produksi protease dengan mengukur *optical density* (OD), aktivitas protease dan kadar protein pada panjang gelombang 660 nm .

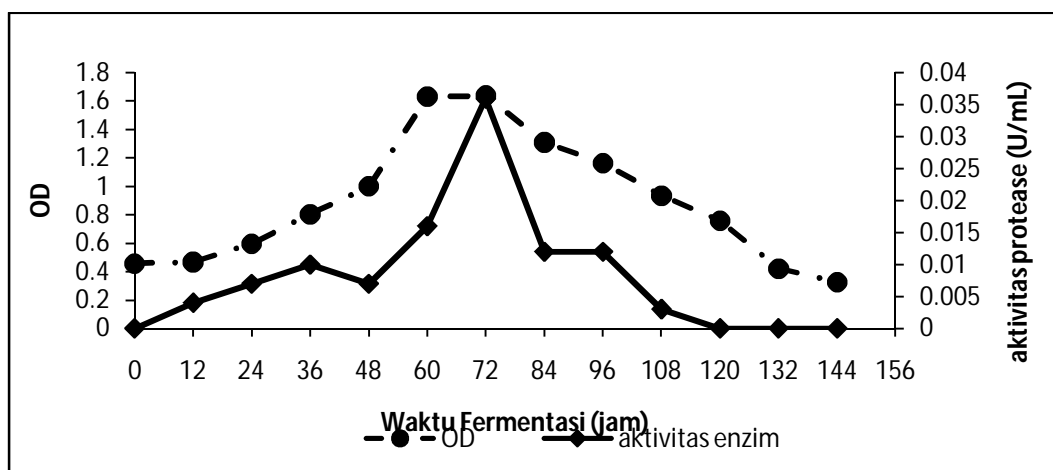
Filtrat merupakan enzim ekstrak kasar (enzim ekstraseluler). Hasil pengujian *optical density* (OD) berdasarkan waktu fermentasi terlihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Data hasil penentuan waktu produksi optimum protease dari bakteri *E. agglomerans* LAS-2b dan *optical density* (OD)

No	Waktu Fermentasi	OD	Aktivitas Enzim (U/mL)
1	0	0,458	0
2	12	0,468	0,004
3	24	0,596	0,007
4	36	0.804	0,010
5	48	1,000	0,007
6	60	1,630	0,016
7	72	1,640	0,036
8	84	1.310	0,012
9	96	1.164	0,012
10	108	0.935	0,003
11	120	0,758	0
12	132	0,420	0
13	144	0,327	0

Data yang diperoleh pada Tabel 5 dapat diketahui bahwa pertumbuhan bakteri mengalami kenaikan dari jam ke-0 sampai jam ke-24. Dalam hal ini bakteri mengalami fase adaptasi dengan lingkungan sehingga pertumbuhannya meningkat tetapi tidak banyak. Pada jam ke-24 sampai jam ke-60 terjadi peningkatan jumlah bakteri. Ini disebabkan pembelahan bakteri yang meningkat karena telah beradaptasi dengan lingkungannya serta nutrisi yang terdapat di dalam medium mencukupi bagi bakteri. Selanjutnya terjadi fase stasioner pada jam ke-60 sampai jam ke-72. Pada fase akhir stasioner tersebut aktivitas protease

maksimum dengan nilai aktivitas enzim sebesar 0,036 U/mL. Hal ini disebabkan pertumbuhan bakteri paling banyak sehingga sekresi enzim pun semakin besar. Pada jam ke-84 sampai jam ke-144 terjadi fase kematian. Ini ditandai dengan menurunnya jumlah bakteri. Hal ini disebabkan terjadinya penurunan nutrisi yang terkandung dalam medium. Selanjutnya data ini digunakan untuk menentukan pH optimum dan suhu optimum aktivitas protease. Data perbandingan antara optical density dengan aktivitas enzim protease terlihat pada Gambar 3.



Enzim protease yang disekresi oleh sel bakteri akan menghidrolisis kasein untuk menghasilkan asam amino. Besarnya aktivitas protease ditentukan berdasarkan jumlah tirosin yang dihasilkan dari hidrolisis kasein yang diukur pada panjang gelombang 670 nm. Satu unit aktivitas protease dinyatakan sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk menghasilkan material yang larut dalam campuran TCA, yang ekuivalen dengan 0,01 mmol tirosin dari larutan kasein 1% (b/v) dibagi waktu inkubasi (Susanti, 2003).

Penelitian Irwan (2012) pada penentuan waktu produksi optimum protease dari *Bacillus licheniformis* HAS₃-1a

aktivitas protease tertinggi terjadi pada jam ke-36 dengan nilai aktivitas 0,394 U/mL.

Pengukuran Kadar Protein dengan Metode Lowry

Penentuan kadar protein dengan menggunakan metode Lowry. Protein dengan asam fosfotungstat-fosfomolibdat pada suasana alkalis akan memberikan warna biru yang intensitasnya bergantung pada konsentrasi protein yang ditara. Konsentrasi protein diukur berdasarkan *optical density* (OD) pada panjang gelombang 625 nm. Untuk mengetahui banyaknya protein dalam larutan, terlebih dahulu dibuat kurva standar yang

melukiskan hubungan antara konsentrasi dan absorbansi (Lampiran 5). Dari kurva standar ini kemudian dibuat persamaan garis lurus

untuk menghitung kadar protein protease (Lampiran 6).

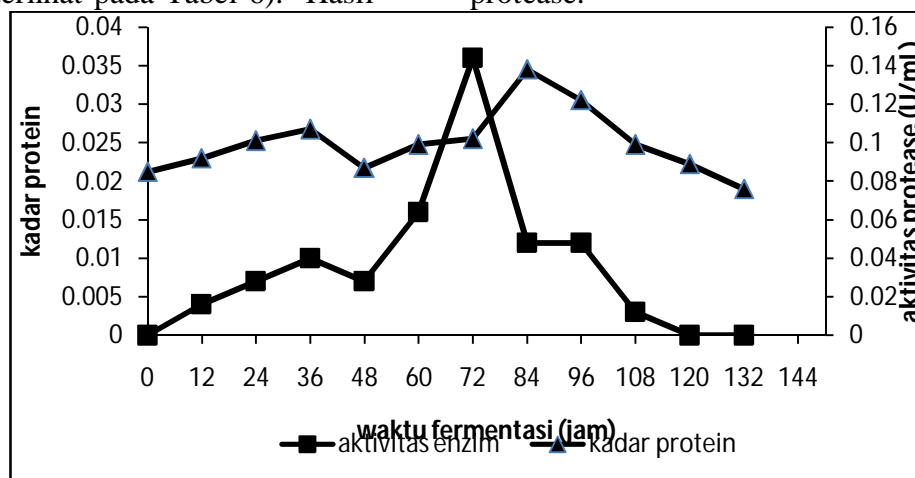
Tabel 6. Data pengukuran kadar protein protease pada panjang gelombang 625 nm

No	Waktu Fermentasi (jam)	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas enzim (U/mL)	Aktivitas spesifik (U/mg)
1	0	0.085	0	0
2	12	0.092	0.004	0.043
3	24	0.101	0.007	0.069
4	36	0.107	0.01	0.093
5	48	0.087	0.007	0.080
6	60	0.099	0.016	0.161
7	72	0.102	0.036	0.353
8	84	0.138	0.012	0.087
9	96	0.122	0.012	0.098
10	108	0.099	0.003	0.030
11	120	0.089	0	0
12	132	0.076	0	0

Nilai kadar protein ekstrak kasar dapat dilihat pada Tabel 6 dan Gambar 4 dimana nilai kadar protein yang tertinggi diperoleh pada produksi protease pada jam ke-84 sebesar 0,138 mg/mL. Sedangkan pada jam ke-72 kadar protein memiliki aktivitas tertinggi yaitu sebesar 0,036 U/mL.

Aktivitas spesifik dapat dihitung dengan membagi aktivitas enzim dengan kadar protein (terlihat pada Tabel 6). Hasil

yang diperoleh menunjukkan bahwa aktivitas spesifik tertinggi terjadi pada jam ke-72 sebesar 0,353 U/mg. Kadar protein yang rendah tetapi aktivitas spesifiknya tinggi berarti enzim protease yang produksi relatif murni. Sedangkan pada jam ke-84 kadar protein tinggi namun aktivitas spesifik rendah. Hal ini menunjukkan bahwa tidak semua protein yang diproduksi adalah enzim protease.



Penelitian Indriyani (2010) kadar protein tertinggi pada produksi protease dari bakteri isolat HMT-3 diperoleh pada produksi jam ke-12 sebesar 0,145 mg/mL dan penelitian Irwan (2012) memperoleh

kadar protein dengan aktivitas tertinggi pada jam ke-36 sebesar 132,35 mg/mL.

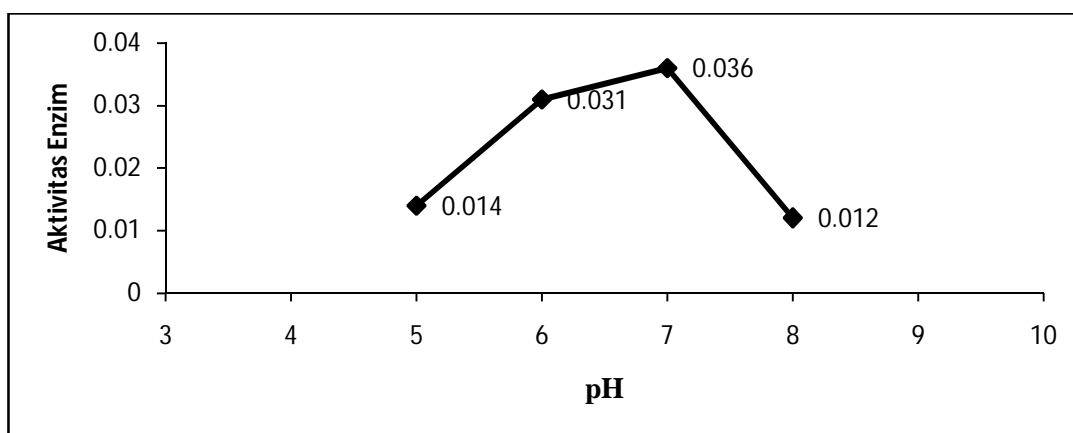
Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Protease dari bakteri *E. agglomerans* LAS-2b

Penelitian ini menggunakan buffer fosfat-sitrat pada berbagai pH yaitu pH 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 pada suhu 37°C. Berdasarkan

Tabel 7. Data perubahan pH terhadap aktivitas protease pada panjang gelombang 660 nm

No	pH	Aktivitas Protease (U/mL)
1	5,0	0,014
2	6,0	0,031
3	7,0	0,036
4	8,0	0,012

hasil penelitian yang diperoleh (Tabel 7 dan Gambar 5), menunjukkan bahwa aktivitas enzim protease mencapai maksimum pada pH 7,0 dengan aktivitas sebesar 0,036 U/mL.



Gambar 5. Pengaruh pH terhadap aktivitas protease dari bakteri *E. agglomerans* LAS-2b pada [S] = 2,0%; suhu=37°C.

Enzim memiliki pH tertentu untuk dapat bekerja dengan baik. Pengaruh pH terhadap keaktifan enzim disebabkan karena perubahan pada keadaan ionisasi komponen-komponen sistem yang terlibat. Enzim adalah protein, maka faktor-faktor yang mempengaruhi struktur protein juga mempengaruhi kestabilan enzim misalnya dalam kondisi terlalu asam atau basa enzim akan terdenaturasi (Dixon dan Webbs, 1979).

Hasil penelitian Hafsah (2007) pada sumber air panas Lejja menunjukkan protease dari *B. licheniformis* memiliki

aktivitas maksimum pada kondisi pH 7,5 dan suhu 80°C, selain itu menurut penelitian Mulyani dkk (2004), protease yang diperoleh dari sumber air panas Plantungan, Kendal, Jawa Tengah memiliki aktivitas maksimum pada suhu 40 °C dan kondisi pH 7,5.

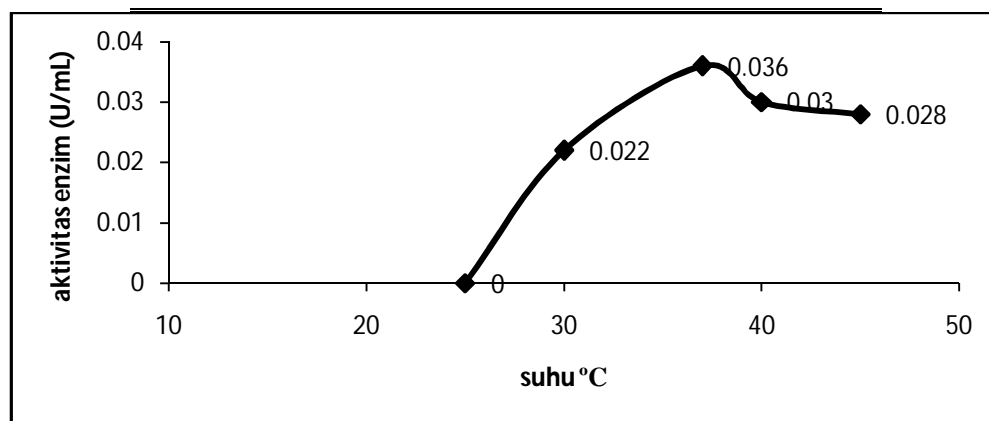
Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Protease dari bakteri *E. agglomerans* LAS-2b

Penentuan suhu optimum protease dilakukan dengan mengukur aktivitas protease pada berbagai suhu

inkubasi dengan menggunakan pH optimum aktivitas enzim protease. Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh (Tabel 8 dan Gambar 6), menunjukkan bahwa protease mencapai aktivitas maksimum pada suhu 37°C sebesar 0,036 U/mL. Aktivitas protease mengalami penurunan setelah mencapai suhu 40°C. Hal ini disebabkan karena pada suhu yang lebih rendah gerak termodinamik antara molekul enzim berkurang sehingga menyebabkan kurangnya tumbukan antara molekul enzim dengan substrat, sedangkan pada suhu yang lebih tinggi gerak termodinamik akan cukup besar, sehingga benturan atau tumbukan antara molekul akan lebih sering terjadi, namun suatu sifat protein bahwa pada suhu

Tabel 8. Data perubahan suhu terhadap aktivitas protease pada panjang gelombang 660 nm

No	Suhu (°C)	Aktivitas Protease (U/mL)
1	25	0
2	30	0,022
3	37	0,036
4	40	0,030
5	45	0,028



Gambar 6. Pengaruh suhu terhadap aktivitas protease dari bakteri *E. agglomerans* LAS-2b pada [S] = 2,0%; pH 7

Penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, dapat diketahui bahwa suhu optimum enzim protease bervariasi bergantung pada spesies bakteri yang menghasilkan enzim protease. Enzim protease yang telah diisolasi dari *Brevibacillus* sp. memiliki aktivitas tertinggi pada pH 8 dan suhu 70°C (Wang, dkk.,

yang relatif tinggi akan menyebabkan terjadinya denaturasi yang mengakibatkan berubahnya struktur tiga dimensi dari bentuk enzim sehingga substrat tidak dapat melekat secara tepat pada sisi aktif enzim (Sadikin, 2002).

Uji pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim dilakukan untuk mengetahui kondisi optimum enzim dalam mendegradasi substrat. Setiap enzim memiliki aktivitas maksimum pada suhu tertentu, aktivitas enzim akan semakin meningkat dengan bertambahnya suhu hingga suhu optimum tercapai. Kenaikan suhu di atas temperatur optimum akan menyebabkan aktivitas enzim menurun (Baehaki, 2011).

2012). Berdasarkan hasil pengukuran aktivitas enzim yang dilakukan oleh Mulyani dkk. (2004) pada berbagai suhu diperoleh bahwa aktivitas tertinggi protease dari sumber air panas Gonoharjo berada pada pH 7,5 dan suhu inkubasi 40°C. Noviyanti dkk (2012) melaporkan aktivitas maksimum protease dari daun sansakng

(*Pycnarrhena cauliflora* Diels) terjadi pada suhu inkubasi 50°C.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa mikroba hasil isolasi dari Sumber Air Panas Lejja Kabupaten Soppeng Sulawesi Selatan teridentifikasi sebagai bakteri *E. agglomerans* LAS-2b, yang memiliki aktivitas protease. Protease dari *E. agglomerans* LAS-2b dapat diproduksi optimum pada jam ke-72 dengan nilai aktivitas 0,036 U/mL. Karakteristik protease dari bakteri *E. agglomerans* LAS-2b bekerja optimum pada pH 7,0 suhu 37°C dengan nilai aktivitas sebesar 0,036 U/mL.

DAFTAR PUSTAKA

1. Belqis, R., 2008, *Kasein pada Susu*, (Online), (<http://queenofsheeba.wordpress.com/2008/10/15/kasein-pada-susu>, diakses 22 Agustus 2012).
2. Ben-Shem, A., 2007, *An Enzyme Out of Water*, (Online), (<http://wanenoor.blogspot.com/2011/06/protein-adalah-senyawa-organik-kompleks.html#.UJPJ2oTzves>, diakses pada 2 November 2012).
3. Champbell., Neil, A., Jane, B., dan Lawrence, G M., 2002, *Biologi edisi kelima Jilid 1*, Erlangga, Jakarta.
4. Fogarty, W.M. and C.J. Kelly, 1979, *Developments in Microbial Extracellular Enzymes*, in Wiseman, A. (ed.), *Topics in Enzymes and Fermentation 3*. Ellis Horwood Limited, Chichester, 45-102.
5. Hafsah, 2007, *Pengaruh suhu dan pH terhadap aktivitas protease bakteri termofilik dari sumber air panas lejja Kabupaten Soppeng Sulawesi Selatan sebagai sumber belajar mikrobiologi*, Tesis S 2 Biologi, Program Pascasarjana Universitas Negeri Malang, Malang.
6. Herdiastuti dan Nuniek, 2009, *Chitinase and Chitinolytic Microorganism: Isolation, Characterization and Potential*, *Indo. J. of Chem*, **9**(1), 37-47.
7. Ihsan, A., 2011, *Kasein*, (Online), (<http://chemistrymyworld.blogspot.com/2011/04/kasein.html>, diakses 25 Agustus 2012).
8. Ikeda, S., M. Sharyou and R. Kurosaka, 2002, *Recent Advanced Technology of Detergent Enzymes*, *Fragrance Journal*, **30**:61-67.
9. Indriyani, 2010, *Pengaruh pH dan Suhu terhadap Aktivitas Protease dari Bakteri Isolat HMT-3*, Skripsi S 1, UNHAS, Makassar.
10. Natsir, H., Chandra, D., Rukayadi, Y., Suhartono, M.T., Hwang, J.K., dan Pyun, Y.R., 2002, *Biochemical Characteristics of Chitinase Enzyme from Bacillus sp. of Kamojang Craater, Indonesia*, *J. Of Biochem., Molecular Biology and Biophysics*, **6** (4), 279-282.
11. Natsir, H., Patong, A. R., Suhartonoo, M.T. dan Ahmad, A., 2010, *Production and Characterization of Chitinase Enzyme from Hot Spring in South Sulawesi, Bacillus sp.*

*Correspondent author phone: +6282345319867,
email: vibe_chemistry@rocketmail.com

- HSA3-1a, *Indo. J. of Chem*, **10**(2), 256-260.
12. Ohno, T., Arman, S., Hatta, T., Nikaidou, N., Henrissat, B., Mitsutomi, M., dan Watanabe, T., 1996, A Modular Family 19 Chitinase Found In The Prokaryotic Organism *Streptomyces griseus*, *J.Bacteriol*, **178**, 5065–5070.
 13. Rahayu, S, F. Tanuwijaya, M.T. Suhartono, J.K. Hwang, dan Y.R. Pyun., 2004, *Study of Thermostable Chitinase Enzymes from Indonesia Bacillus K29-14*, *Microbiol and Biotech* 4 : 647 : 652.
 14. Rahayu, S., 2004, *Karakteristik Biokimiawi Enzim Termotabil Penghidrolisis Kitin* (Online), Disertasi tidak diterbitkan, Sekolah Pasca Sarjana , Institut Pertanian Bogor, Bogor,
 - (<http://www.rudycet.com/PPS702-ipb/09145/sriRahayu.pdf>, diakses 22 Agustus 2012).
 15. Rao, M.M., A.M. Tanksale, M.S. Gatge, V.V. Desphande, 1998, Molekular And Biotechnological Aspect Of Microbial Protease, *Mikrobiol. And Mol. Biol. Rev.*, **62**(3):597-635.
 16. Winarno, F. G., 1984, “Kimia Pangan dan Gizi” halaman 52-62,67-69, Gramedia, Jakarta.
 17. Wilson, P. And Remigio, Z., 2012, Production and characterisation of Protease Enzyme Produced by a Novel Moderate Thermophilic Bacterium (EP1001) Isolated from an Alkaline Hot Spring, Zimbabwe, *Journal of Microbiology Research*, **6**(27), 5542-5551.